

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/48284> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Baggelaar, M.P.

Title: Activity-based protein profiling of diacylglycerol lipases

Issue Date: 2017-04-06

Samenvatting

Sinds de ontrafeling van het humane genoom is de exacte volgorde van de individuele basenparen van het menselijk DNA bekend, en daarmee zijn vrijwel alle genen die coderen voor de eiwitten in ons lichaam ontdekt. Eiwitten katalyseren biochemische reacties in onze cellen en reguleren de fysiologische functie van onze organen. Het gebrekkig functioneren van eiwitten is de onderliggende oorzaak van veel ziekten. Daarom is inzicht in de functie van eiwitten die betrokken zijn bij ziekten van cruciaal belang voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Hoewel een gen de exacte volgorde van de aminozuren bepaalt waaruit een eiwit wordt opgebouwd, kan er slechts beperkte informatie uit worden afgeleid met betrekking tot de biochemische functie van een eiwit. Dit komt doordat kleine verschillen in aminozuur-volgorde grote veranderingen in functie kunnen veroorzaken, wat het voorspellen van de exacte rol van een eiwit moeilijk maakt.

Een van de grote uitdagingen in de chemische biologie is het in kaart brengen van de fysiologische functies van eiwitten. Kennis van de functie van eiwitten kan ons helpen begrijpen hoe het gezonde menselijk lichaam werkt, maar ook welke processen verstoord zijn tijdens een ziekte. Het verwijderen van een gen of het verhinderen van de vorming van het eiwit in de cel zijn veel toegepaste methoden om de functies van eiwitten te ontrafelen. Deze methodes maken het mogelijk om fysiologische veranderingen in een cel als gevolg van de afwezigheid van het eiwit te bestuderen. Genetische methodes zijn zeer waardevol, omdat ze heel specifiek zijn voor een bepaald eiwit, breed toepasbaar en onafhankelijk van het biologische systeem kunnen worden ingezet. Ze hebben echter ook enkele nadelen. Er wordt bijvoorbeeld geen onderscheid gemaakt tussen de katalytische en structurele functies van een eiwit. Tevens is het niet mogelijk om het eiwit slechts tijdelijk uit te schakelen, maar alleen permanent. Hierdoor heeft de cel de mogelijkheid om alternatieve biochemische routes in te schakelen ter compensatie van de functie van het verwijderde gen.

De toepassing van kleine moleculen is een tweede methode om de rol van eiwitten in de cel te bestuderen. Met behulp van kleine moleculen kunnen enkele nadelen van genetische technieken worden omzeild. Deze methode maakt het bijvoorbeeld mogelijk om de functie van eiwitten tijdelijk te moduleren. Tevens bieden deze stoffen aanknopingspunten voor de ontwikkeling van potentiële medicijnen. Een nadeel is dat de stoffen vaak niet specifiek zijn en dus de functie van meerdere eiwitten tegelijkertijd moduleren. Dit kan bijwerkingen veroorzaken.

Dit proefschrift beschrijft een nieuwe methode om kleine moleculen voor eiwitten te identificeren die zeer specifiek zijn voor een bepaald eiwit en dus zo min mogelijk bijwerkingen vertonen. Het proefschrift focust op diacylglycerol lipases die behoren tot de eiwitfamilie van de α,β -hydrolases, en die verantwoordelijk zijn voor de productie van

2-arachidonoylglycerol (2-AG). 2-AG is een endocannabinoïde, een soort van lichaamseigen marihuana dat betrokken is bij vele functies in de hersenen, zoals geheugen vorming, het voelen van pijn en het reguleren van het lichaamsgewicht. Het is de verwachting dat diacylglycerol lipases betrokken zijn bij veel uiteenlopende ziekten, zoals ontstekingen in de hersenen en overgewicht. Om dit te bestuderen is het daarom van belang om kleine moleculen te vinden die heel specifiek de activiteit van diacylglycerol lipases kunnen remmen.

In dit proefschrift wordt “activity-based protein profiling” (ABPP) als een techniek toegepast om kleine, zeer selectieve moleculen voor diacylglycerol lipases te ontdekken. Deze techniek maakt gebruik van fluorescente stoffen, zogenaamde “activity-base probes” (ABPs), die een covalente binding vormen met het katalytische aminozuur van het eiwit. Hierdoor is deze methode zeer geschikt voor het bestuderen van de diacylglycerol lipases en alle andere de α , β -hydrolase domein bezittende eiwitten. De kracht van deze techniek is dat de ABP alleen een binding aangaat met een eiwit dat functioneel actief is. Daarnaast is deze techniek uniek, omdat het werkt in levende cellen, organen en zelfs dieren. Dit is belangrijk omdat de activiteit en lokalisatie van vele eiwitten wordt gereguleerd door posttranslationele modificaties en eiwit-eiwit interacties.

In **hoofdstuk 1** wordt de ABPP-methode beschreven en wordt uitgelegd hoe deze techniek kan worden toegepast om de interactie tussen kleine moleculen en eiwitten te bestuderen. Wanneer een verzameling van eiwitten, ook wel proteoom genoemd, eerst wordt behandeld met een remmer en daarna met een ABP kan door middel van het meten van de fluorescentie de affiniteit van het kleine molecuul voor het eiwit bepaald worden.

Hoofdstuk 2 beschrijft de fysiologische rol van 2-AG in de hersenen. Deze rol is intensief onderzocht door middel van modulatie van de activiteit van de eiwitten die verantwoordelijk zijn voor de synthese en afbraak van 2-AG. Dit endocannabinoïde activeert de cannabinoid CB₁ receptor in de hersenen en speelt een rol bij hersenontstekingen, angst en verslaving. 2-AG heeft niet alleen een belangrijke rol als signaallipide voor de CB-receptoren, maar is ook een tussenproduct voor de vorming van arachidonzuur en ontstekings-stimulerende prostaglandinen. De affiniteit van 2-AG voor GPR55, TRPV1, GABA_A and Adenosine A₃ receptoren wordt ook beschreven. Aangezien 2-AG een belangrijke rol speelt in meerdere ziekteprocessen worden de enzymen die betrokken zijn bij de vorming en afbraak van 2-AG beschouwd als interessante eiwitten voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de ontwikkeling van een ABP voor diacylglycerol lipase- α (DAGL- α). Het ontwerp van de ABP is gebaseerd op het geneesmiddel Orlistat[®] (THL) dat wordt gebruikt voor de behandeling van obesitas. Dit molecuul staat bekend als remmer van verschillende lipases in de alvleesklier, maar ook als remmer van DAGL- α . Het molecuul is gesynthetiseerd met een fluorescent label voor visualisatie en een biotine voor zuivering en identificatie. Deze ABP (MB064) bood de unieke mogelijkheid om de activiteit van DAGL- α in zijn natuurlijke omgeving te meten en visualiseren. Remming van

DAGL- α is een mogelijke strategie zijn voor de behandeling van obesitas, maar ook voor ziektes waarin neuroinflammatie een rol speelt, zoals de ziekten van Alzheimer, Parkinson en Multiple Sclerosis. Met behulp van deze ABP en een biochemische assay is een kleine bibliotheek van verbindingen getest voor remming van de activiteit van DAGL- α . Dit heeft geleid tot de identificatie van een reversibele DAGL- α remmer LEI104. Deze stof was uiterst selectief voor DAGL- α . LEI104 vertoonde interactie met maar één extra eiwit, namelijk fatty acid amide hydrolase (FAAH). Dit eiwit is verantwoordelijk voor de afbraak van het andere endocannabinoïde anandamide. Om de rollen van 2-AG en anandamide te kunnen onderscheiden is het belangrijk om selectiviteit over FAAH te verkrijgen.

Hoofdstuk 4 beschrijft het verbeteren van LEI104 tot een meer selectieve remmer. Met behulp van computer simulaties werd inzicht verkregen in de manier waarop LEI104 kon worden verbeterd. Dit leidde tot ontwikkeling van een nieuwe remmer (LEI105). Deze stof was tien keer actiever op zowel DAGL- α als DAGL- β . Om de selectiviteit van deze remmer te bestuderen werd er een competitieve en vergelijkende ABPP methode opgezet, die gebruik maakt van twee ABPs. Deze methode, chemical proteomics genoemd, kan worden gebruikt om de selectiviteit van de stoffen te bepalen over een grote groep eiwitten die aanwezig zijn in de hersenen. Deze methode toonde aan dat LEI105 een zeer selectieve remmer was. Er was geen affiniteit meer voor FAAH of andere eiwitten die betrokken zijn bij de synthese of afbraak van endocannabinoiden. Vervolgens werd de activiteit van LEI105 in levende cellen en muizen hersenen getest. Hiermee werd aangetoond dat LEI105 de meest selectieve remmer voor DAGLs tot op heden is. LEI105 werd gebruikt om belangrijke vraagstukken over de functie van DAGLs te beantwoorden.

Hoofdstuk 5 is gericht op de optimalisatie van de activiteit van LEI105 en verbetering van de farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van de remmer. Een serie van variaties op LEI105 is gemaakt waarbij de para-tolueen groep is vervangen door andere gesubstitueerde fenylen of heterocyclische groepen. Dit heeft geresulteerd in de identificatie van remmer **16**. Deze verbinding had een hogere activiteit tegen DAGL- α vergeleken met LEI105. Daarnaast was dit molecuul ook minder vet dan LEI105. In een DAGL- α assay die gebruik maakt van het natuurlijk substraat liet verbinding **16** een pIC_{50} van 7.6 ± 0.11 zien. Het is interessant om deze stof verder te karakteriseren met het oog op *in vivo* actieve remmers.

Hoofdstuk 6 past de competitieve en vergelijkende ABPP met twee ABPs toe op verschillende hersengebieden. Hierdoor kon de relatieve activiteit van de α,β -hydrolase domein bezittende eiwitten die een rol spelen in het endocannabinoïde metabolisme, zoals ABHD4, ABHD6, ABHD12, MAGL, FAAH en DAGL- α , bestudeerd worden in de hippocampus, striatum, cerebellum en frontale cortex. Er werd ontdekt dat de endocannabinoid hydrolase activiteit van de verschillende eiwitten niet evenredig verdeeld was over de hersengebieden. Daarnaast is de methode toegepast om te aan te tonen dat de cannabinoid CB₁ receptor geen regulerende functie heeft op de activiteit van de eiwitten die verantwoordelijk zijn voor de vorming en afbraak van endocannabinoiden.

Hoofdstuk 7 beschrijft de systematische zoektocht naar α,β -hydrolase domein bezittende eiwitten die gedetecteerd worden door de ABPs die zijn ontwikkeld in hoofdstuk 3. Met behulp van chemical proteomics is gebleken dat ongeveer 66 α,β -hydrolase eiwitten gedetecteerd kunnen worden in de milt, long, alvleesklier, hersenen, hart, testikels, nier en lever van muizen. De ABPs zijn hierdoor erg geschikt voor het ontdekken van nieuwe remmers voor eiwitten waarvan de functie nog niet bekend is. Om dit te demonstreren is een bibliotheek van 206 verschillende stoffen getest op de activiteit van ABHD2, ABHD3, ABHD4, ABHD6, ABHD11, ABHD12 en ABHD16A. Dit resulteerde in de ontdekking van α -ketoamide **60** en urea **183** als remmers voor ABHD2 en ABHD3, respectievelijk. Kort geleden is ontdekt dat ABHD2 2-AG een hydrolase is die de activatie van spermatoïden reguleert. Remming van ABHD2 activiteit zou in de toekomst mogelijk toegepast kunnen worden als mannelijk anticonceptie middel. ABHD3 hydrolyseert fosfatidylcholines met kortere vetzuurstaarten die oxidatief gemodificeerd zijn. Deze laatste groep van verbindingen is mogelijkerwijs betrokken bij de inductie van celsterfte en atherosclerose. De beschreven stoffen in dit hoofdstuk zijn nuttige gereedschappen om de exacte functies van ABHD2 en ABHD3 verder te onderzoeken.

Ten slotte, de ontwikkeling van MB064 als nieuwe activity-based probe, zoals beschreven in dit proefschrift, heeft een belangrijke rol gespeeld in het ontsluiten van het onderzoeksveld van de diacylglycerol lipases. Het eiwit kan nu beter bestudeerd worden in cellen en diermodellen en nieuwe remmers voor dit eiwit kunnen nu eenvoudiger worden ontdekt. Remmers van diacylglycerol lipases kunnen leiden tot potentieel nieuwe therapeutische behandelingen van obesitas en neuroinflammatoire ziektes, zoals de ziekte van Alzheimer, ziekte van Parkinson en Multiple Sclerosis. Daarnaast is de verwachting dat MB064 en gerelateerde activity-based probes een belangrijke rol gaan spelen in het identificeren van kleine moleculen voor andere eiwitten uit de α,β -hydrolase familie.